中华蜜蜂溶血肽基因在杆状病毒系统中的表达

施婉君[1,2]，**张传溪**[1*]，**程家安**[1*]

（1. 浙江大学应用昆虫学研究所，杭州　310029；2. 上海交通大学农业与生物学院资源环境科学系，上海　201101）

摘要：构建含中华蜜蜂溶血肽基因的重组转移载体 pBacHT-GFPTAccM，转化受体菌 DH10Bac，得重组穿梭载体 Bacmid-GFPTAccM，Lipofectin 介导其基因组 DNA 转染粉纹夜蛾细胞系 Tn-5B1-4。SDS-PAGE 分析表明，感染重组杆状病毒 Bacmid-GFPTAccM 的细胞表达产物在约为 34 kD 处出现特异性条带，其表达量约占细胞总蛋白的 3%。Western blotting 和细胞表达时相动态分析证明中华蜜蜂溶血肽基因已在粉纹夜蛾细胞系 Tn-5B1-4 中进行了成功的表达。

关键词：中华蜜蜂；溶血肽；表达；杆状病毒系统；粉纹夜蛾细胞系

中图分类号：Q966　　文献标识码：A　　文章编号：0454-6296(2006)01-0016-06

Expression of the *melittin* gene from *Apis cerana cerana* in baculovirus system

SHI Wan-Jun[1,2]，ZHANG Chuan-Xi[1*]，CHENG Jia-An[1*]（1. Institute of Applied Entomology，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China；2. Department of Gardening and Environmental Science，School of Agriculture and Biology，Shanghai Jiaotong University，Shanghai 201101，China）

Abstract：A cDNA fragment encoding *melittin* from *Apis cerana cerana* was obtained by restriction enzyme digestion from the recombinant plasmid pGEM-AccMT，and inserted into the multiple cloning site of the pBacHTeGFPT to construct the recombinant donor plasmid pBacHT-GFPTAccM，which was transposed to the target Bacmid in *E. coli* (DH10) by Tn7 transposition function. Then Bacmid-GFPTAccM recombinant genome DNA was used to transfect Tn-5B1-4 cell of the cabbage looper，*Trichoplusia ni*，mediated by lipofectin. The expressed protein band of about 34 kD was determined by SDS-PAGE，and the thin layer scanning showed that the expression amount of GFPT-AccM fusion protein was about 3% of the total cell protein. Western blotting and the cytopathic effect of Tn cell after infection of Bacmid-GFPTAccM at different time proved that the fusion protein GFPT-AccM had been successfully expressed in Tn-5B1-4 cell.

Key words：*Apis cerana cerana*；melittin；expression；baculovirus system；*Trichopllusia ni* cell line

蜜蜂在毒腺细胞中将前溶血肽原基因 mRNA 翻译成前溶血肽原(prepromelittin)，并进一步将其加工成溶血肽原(promelittin)。溶血肽原是蜂毒溶血肽的天然融合蛋白，无活性，由 52 个氨基酸组成，在毒腺细胞中经二肽酶Ⅳ水解最终生成溶血肽(melittin)蛋白(Vlasak *et al*., 1983)。溶血肽则位于前溶血肽原肽链的 COOH-端(第 44～70 位残基)，具有 27 个氨基酸。蜂毒溶血肽是蜂毒的主要活性物质，属于蛋白质多肽类，是意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 蜂毒的最主要成分，约占蜂毒干重的 40%～50%，呈强碱性，pH 10，具两亲性和热稳定性；它具有很强的生物学活性，可引起红细胞裂解、脂质体释放标记离子以及肥大细胞释放组胺(Habermann，1972)，尤其是对细胞膜具有很强的表面活性，其透过卵磷脂膜和混合脂膜的速度为任何表面活性剂所不及，这一性质使其受到生物膜研究工作者的高度重视，现已成为一种模型肽，已被广泛应用于膜作用机制、钙调蛋白作用机理等方面的研究(李大力等，2002)。

基金项目：上海交通大学院青年基金(AE150054)；国家自然科学基金(30271008)

作者简介：施婉君，女，1975 年 9 月生，浙江黄岩人，博士，讲师，主要从事昆虫分子生物学和环境生物技术方面的研究，E-mail：wjshi@sjtu.edu.cn

[*] 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：chxzhang@zju.edu.cn；jacheng@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2005-05-10；接受日期 Accepted：2005-11-18

自从20世纪70年代以来，中外学者已对意大利蜜蜂蜂毒溶血肽作了一系列卓有成效的研究（Habermann，1972；Vlasak *et al*.，1983；黄雪强等，2001；Enrique *et al*.，2002；Sumikura *et al*.，2003），刘艳荷等（2001）对蜂毒溶血肽的研究进行了归纳与总结。我国虽是养蜂业的发祥地之一且是世界上第一养蜂大国，但迄今为止对起源于我国、并在我国广泛分布的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蜂毒的分子生物学方面的研究甚少。为此，我们实验室对中华蜜蜂蜂毒的分子生物学开展了一系列研究（沈立荣等，2002；施婉君等，2003；张素方等，2003；Shi *et al*.，2004）。本研究在先前报道的基础上，将已克隆鉴定的中华蜜蜂溶血肽基因构建在带有增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）基因标记的重组杆状病毒穿梭载体 pBacHTeGFPT 中，利用 Bac-to-Bac 杆状病毒-昆虫表达系统对其在粉纹夜蛾细胞系 Tn-5B1-4 中进行了成功的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒、细胞株和细胞培养基：Bac-to-Bac baculovirus expression system、Lipofectin、胎牛血清为 Invitrogen 公司产品；昆虫细胞培养基 Tnm-fh insect medium、纯度为93%（HPLC）的天然欧洲意大利蜜蜂蜂毒溶血肽蛋白为 Sigma 公司产品；粉纹夜蛾细胞系 Tn-5B1-4（Tn 细胞）由中科院上海细胞生化研究所吴祥甫研究员赠送；pBacHTeGFPT 重组杆状病毒载体由本实验室张传溪教授构建（载体内含有增强型绿色荧光蛋白基因 EGFP 和 His tag 标记）；兔抗溶血肽（与卵清蛋白交联后的总蛋白）多克隆抗体为本实验室利用天然欧洲意大利蜜蜂蜂毒溶血肽蛋白与卵清蛋白交联的总蛋白作抗原免疫家兔制备的多克隆抗体。

1.1.2 酶和化学试剂：DNA 限制性内切酶、IPTG 和 X-gal 为 TakaRa 公司产品；T_4 DNA 连接酶、辣根过氧化酶底物 DAB、山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP 和硝酸纤维膜为 Promega 公司产品；SDS-PAGE 电泳低分子量标准蛋白、His-Tag® Monoclonal Antibody 为 Novagen 公司产品；其他常规试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 杆状病毒转移载体的构建：用限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双切中华蜜蜂重组质粒 pGEM-AccMT，得到 AccMT（81 bp 溶血肽基因 + 413 bp pGEM® -T easy vector 序列部分）片段，克隆到重组杆状病毒供体质粒 pBacHTeGFPT 相应的酶切位点中，得到重组质粒 pBacHT-GFPTAccMT。再用限制性内切酶 *Hin*dⅢ和 *Xho*Ⅰ双酶切去除该重组质粒中的 pGEM® -T easy vector 序列部分，Klenow 酶将粘端补平后，利用 T_4 DNA 连接酶进行质粒自我环化，得到含有中华蜜蜂蜂毒溶血肽基因的重组杆状病毒转移载体 pBacHT-GFPTAccM。

1.2.2 重组杆状病毒 DNA 的获得：将带有绿色荧光标记基因的重组杆状病毒转移载体转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞（该细胞含有穿梭质粒 bacmid 和辅助质粒）。37℃下110 r/min 振荡培养5 h后，转移质粒在辅助质粒提供的转座酶的作用下发生转座，多角体启动子控制的表达盒被插入 bacmid 的 *LacZ* 编码区中。转化细胞，在含有 IPTG 40 μg/mL、X-gal 100 μg/mL、卡那霉素 50 μg/mL、庆大霉素 7 μg/mL、四环素 10 μg/mL 的 LB 平板上进行2轮筛选，用碱法提取重组病毒 DNA。再分别用溶血肽引物（FP1-AccM 引物序列为 5′-CGTGGATCCGGAATTGGAGCAGTTCTC-3′；RP2-AccM 引物序列为 5′-CGGAAGCTTCTAACCCTGTTGCCTCTT-3′）和设在 *LacZ* 基因上下游的 PUC/M13 引物（Bacmid-FP1 引物序列为 5′-GTAAAACGACGGCCAGT-3′；Bacmid-RP2 引物序列为 5′-AACAGCTATGACCATG-3′）进行 PCR 扩增，其中扩增溶血肽基因片段的 PCR 反应条件为94℃预变性3 min，然后94℃ 40 s，54℃ 40 s，72℃ 1 min，30个循环，最后72℃延伸10 min；扩增重组病毒 Bacmid-GFPTAccM DNA 片段的 PCR 反应条件为94℃预变性3 min，然后94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 2 min、30个循环，72℃延伸10 min，最后鉴定并筛选出重组杆状病毒 Bacmid-GFPTAccM 的 DNA。载体构建流程见图1。

1.2.3 昆虫细胞的培养和转染：参考张传溪和吴祥甫（1998）和张传溪等（1999）的方法，取重组 Bacmid-GFPTAccM 的基因组 DNA，在 Lipofectin 介导下转染粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4，5天后收取有明显病毒感染症状的细胞上清，再次转染 Tn-5B1-4 细胞进行病毒扩增。传代转染4次后，收获细胞，抽提病毒基因组 DNA，分别用溶血肽和 PUC/M13 引物进行 PCR 鉴定后，保留细胞上清用于再次转染 Tn-5B1-4 细胞，同时用 Bacmid 转染的 Tn-5B1-4 细胞作阴性对照。

1.2.4 SDS-PAGE分析：分别取经 Bacmid-GFPTAccM 感染4天后的 Tn-5B1-4 细胞和阴性对照，2 000

g/min离心 5 min，弃上清，1 × PBS（pH 7.3）缓冲液洗涤 3 次，加 6 × SDS 上样缓冲液，12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白，考马斯亮蓝染色观察结果，并用薄层扫描分析融合蛋白的含量。

1.2.5 Western blotting：表达产物和阴性对照经 SDS-PAGE 电泳后，电转移至硝酸纤维膜（NC）膜上；常温下用封闭液（PBST + 5%脱脂奶粉）封闭 1 h 接着分别与兔抗溶血肽多克隆抗体、His-Tag® Monoclonal Antibody 室温反应 1.5 h，用洗脱液 PBST 洗膜 3 次，每次 10 min 然后分别加入以封闭液稀释的山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP 为二抗，室温反应 1.5 h，用洗脱液洗膜 3 次，再将此两张 NC 膜分别置于含有 DAB 的显色液中显色，当 NC 膜上出现清晰条带后终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 重组病毒 **DNA** 的获得

将经 PCR 鉴定后的重组杆状病毒转移载体 pBacHT-GFPTAccM 转化带有穿梭载体和辅助质粒的大肠杆菌 DH10Bac（图 1），挑取白色菌落，提取病毒基因组 DNA 后，分别用溶血肽引物和 PUC/M13 引物扩增进行 PCR 检测，分别得到约 81 bp 和 3 101 bp 的片段。未发生重组的 Bacmid，以 PUC/M13 引物扩增得到的片段大小为 300 bp 重组后的 Bacmid，经相应的 PCR 扩增得到的片段大小为转座子内侧片段 2 300 bp与克隆片段 801 bp 之和，故用 PUC/M13 引物扩增最终所得到的扩增片段大小为 3 101 bp。

2.2 重组 **Bacmid** 转染粉纹夜蛾细胞及病毒扩增

在无血清条件下，用 Lipofectin 介导 Bacmid-GFPTAccM 的基因组 DNA 转染生长状态良好的粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4。荧光倒置显微镜下观察感染重组病毒 96 h 中的细胞感染症状：感染 16 h 后的 Tn 细胞出现荧光，24 h 后荧光较弱，以后亮度逐渐上升，96 h 时荧光亮度最强，并且细胞破碎状态依稀可见（图 2）。为了更进一步证明重组病毒中中华蜜蜂溶血肽基因的存在，从感染重组病毒的细胞中提取病毒 DNA，再分别用溶血肽和 PUC/M13 引物进行 PCR 扩增检测，结果均在约 80 bp 和 3 000 bp 处有明显的阳性条带，与目的片段大小相符（图 3）。证明

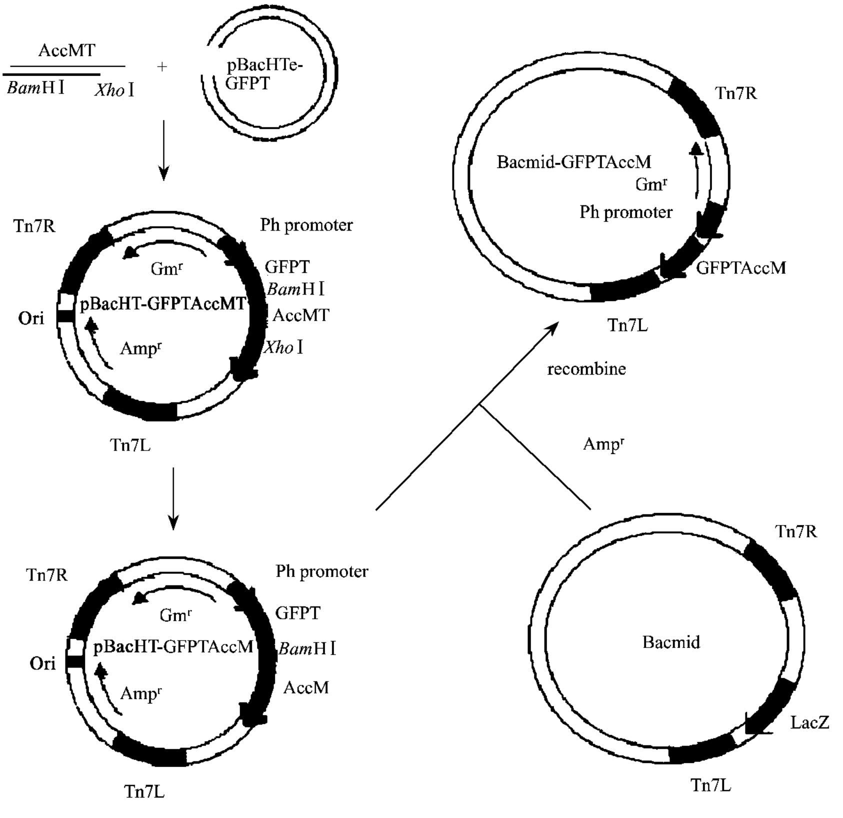

图 1 杆状病毒转移载体的构建及其与 Bacmid 的重组

Fig. 1 Construction of donor plasmid and recombinant Bacmid-GFPTAccM

带有中华蜜蜂溶血肽基因的重组病毒 Bacmid-GFPTAccM 已在昆虫细胞中进行了扩增。

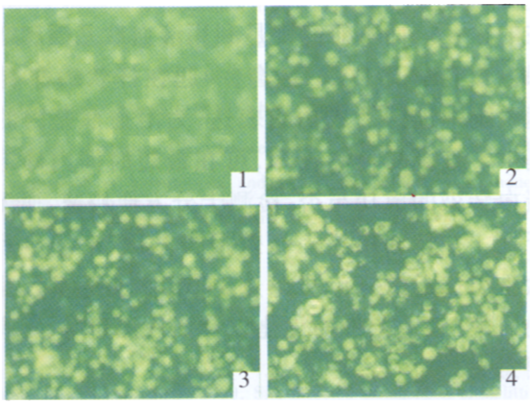

图 2　感染 Bacmid-GFPTAccM 96 h 内 Tn-5B1-4 细胞的状态比较

Fig. 2　Comparison of Tn-5B1-4 cell condition during 96 hours after being infected with Bacmid-GFPTAccM

1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h; 4: 96 h

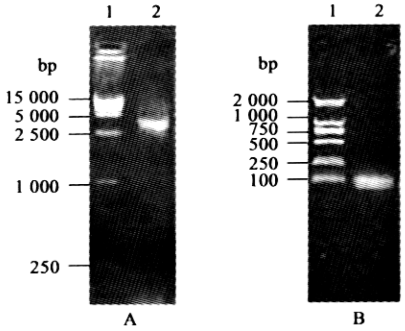

图 3　Tn 细胞内重组病毒 Bacmid-GFPTAccM 的 PCR 检测

Fig. 3　PCR assay of Bacmid-GFPTAccM in Tn cells

A. 用 PUC/M13 引物做 PCR 检测 PCR assay with PUC/M13 primers;
B. 用溶血肽引物做 PCR 检测 PCR assay with melittin primers.
1: 分子量标记 Marker; 2: 目的片段 Target fragment.

2.3　重组杆状病毒表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

收获被 Bacmid-GFPTAccM 感染的细胞，进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示在约 34 kD 处出现特异性表达条带(图 4)，这与预期的 GFPTAccM 融合蛋白约 34.6 kD（其中 EGFP 编码 239 个氨基酸残基，溶血肽编码 27 个氨基酸残基）相近。经薄层扫描分析，中华蜜蜂与 EGFP 融合蛋白的表达量约占细胞总蛋白的 3%。

2.4　Western blotting 分析

Western blotting 分析表明，感染中华蜜蜂溶血肽基因重组病毒 Bacmid-GFPTAccM 的 Tn-5B1-4 细胞抽提物，分别在约 34 kD 处与 His-Tag® Monoclonal Antibody 和兔抗溶血肽多克隆抗体均有明显的交叉反应，而阴性对照即感染 Bacmid 的 Tn-5B1-4 细胞抽提物则与两抗体均无免疫交叉反应，表明中华蜜蜂溶血肽基因在昆虫细胞中进行了正确的表达，所表达的融合蛋白具有良好的免疫原性，且表达产物带有 His tag 标记(图 5)。

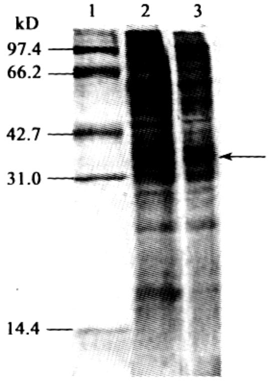

图 4　GFPTAccM 在 Tn 细胞中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of Bacmid-GFPTAccM expression products in Tn cells

1: 蛋白分子量标准 Marker; 2: Bacmid 病毒感染的细胞总抽提物(阴性对照) Total extracts of Tn cells infected with Bacmid (negative control); 3: 感染 Bacmid-GFPTAccM 病毒的细胞总抽提物 Total extracts of Tn cells infected with Bacmid-GFPTAccM.

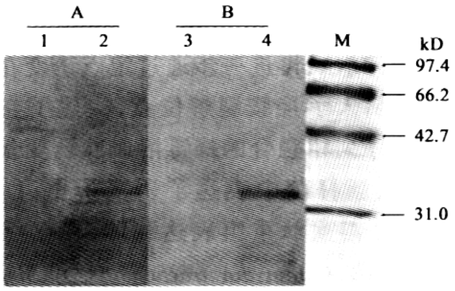

图 5　GFPTAccM 在 Tn 细胞中表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 5　Western blotting analysis of Bacmid-GFPTAccM expression products in Tn cells

A: 一抗为兔抗溶血肽多抗 Melittin binding OVA antigen as the primary antibody; B: 一抗为 His-Tag 单抗 His-Tag® monoclonal antibody as the primary antibody. 1,3: Bacmid 病毒感染的细胞总抽提物(阴性对照) Total extracts of Tn cells infected with Bacmid (negative control); 2,4: 感染 Bacmid-GFPTAccM 病毒的细胞总抽提物 Total extracts of Tn cells infected with Bacmid-GFPTAccM; 5: 蛋白分子量标准 Marker.

3 讨论

由于溶血肽基因片段很短，只有 81 bp，为便于克隆操作，在紧跟目的基因 3’端处 pGEM -T easy vector 序列的 413 bp 处设计引物，经 PCR 反应从带有中华蜜蜂前溶血肽原基因的重组质粒 pGEM-AccPPM 中扩增出 3′端带有 413 bp pGEM® -T easy vector 序列部分的溶血肽基因片段，克隆入 pGEM® -T easy vector 中，形成重组质粒 pGEM-AccMT。

构建于供体质粒 pBacHTeGFPT 的 GFPTAccM 基因，处在多角体蛋白基因强启动子控制之下，它们的表达产物带有 6 × His tag 标记。Western blotting 和 96 h 全程监测感染细胞的时空变化状态证明，重组病毒已在昆虫细胞中进行了成功的表达。其感染症状与阴性对照（感染 Bacmid）相似，转染前为生长状态良好的梭形细胞，加入重组病毒 12 h 后开始显示感染症状，24 h 后分裂基本停止，48 h 后变为圆球状，72 h 后开始出现破碎，96 h 后细胞破碎状态非常明显，大部分悬浮在培养液中，这说明细胞中的表达产物——融合蛋白对细胞不具有明显的毒性。

Winder 等（1998）报道了溶血肽基因在人类膀胱癌细胞系和裸鼠中的表达，发现溶血肽具有抗肿瘤活性；王关林等（2000）从欧洲意大利蜜蜂毒腺中提取总 RNA，通过 RT-PCR 方法扩增得到了蜂毒溶血肽原蛋白的 cDNA，再进一步通过定点诱变在蜂毒溶血肽序列前引入了羟胺裂解位点，构建了与 β-半乳糖苷酶部分序列相融合的蜂毒溶血肽诱变蛋白表达载体，并在大肠杆菌中表达了诱变蛋白；Lazarev 等（2002）构建了溶血肽重组表达载体，在已感染尿生殖系统病原菌 *Chlamydia trachomatis* 和 *Mycoplasma hominis* 的海拉细胞系上进行表达，结果发现表达产物有效地抑制了以上两种病原菌的活性；Lazarev 等（2004）又构建了溶血肽表达载体，在已感染支原菌 *Mycoplasma gallisepticum* 1226 的小鸡上进行活体试验，表达先后鸡的有关病理学症状、血清学症状和组织切片结果等都充分地证明：溶血肽蛋白有效地抑制了该菌的活性，有效地阻止了该支原菌在鸡呼吸气管和内脏中的进一步侵袭。基于溶血肽蛋白所具有的重要功能，Shi 等（2004）利用谷胱甘肽基因融合表达系统构建了中华蜜蜂溶血肽基因的大肠杆菌诱导表达载体 pGEX-AccM，在 BL21 中进行了高效表达，最佳表达条件下表达量可占细菌总蛋白的 15.2%。以上的工作主要分两类，一是溶血肽基因在细胞及活体中的表达，主要是为了研究溶血肽的功能；二是溶血肽基因在大肠杆菌中的表达，主要是为人类利用基因工程生产蜂毒溶血肽蛋白提供一个潜在的途径。而本研究则是利用溶血肽基因和增强型绿色荧光基因 EGFP 融合，一起在杆状病毒-昆虫表达系统中进行了成功的表达，为溶血肽基因的表达提供了直接的检测技术，可在最短时间内确定重组蛋白转染的成功与否，检测十分方便快速，而无背景干扰。并且利用这一高效报告基因，对于今后溶血肽重组病毒的进一步筛选、前溶血肽原基因信号肽的研究、表达条件的优化以及活性测定等，都具有重要意义。

参考文献（References）

Habermann E，1972. Bee and wasp venoms. *Science*，177：314 – 322.

Huang XQ，Ling CQ，Chen Z，Zhang CH，Yu CQ，2001. Apoptosis of human acute T lymphocyte leukemia cell line 6T-cem induced by melittin. *Journal of Anhui TCM College*，20（5）：39 – 41.［黄雪强，凌昌全，陈哲，张澄海，俞超芹，2001. 蜂毒素诱导人 T 淋巴细胞白血病细胞株 6T-CEM 的凋亡作用. 安徽中医学院学报，20（5）：39 – 41］

Lazarev VN，Parfenova TM，Gularyan SK，Misyurina OY，Akopian TA，Govorun VM，2002. Induced expression of melittin，an antimicrobial peptide，inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. *International Journal of Antimicrobial Agents*，19：133 – 137.

Lazarev VN，Stipkovits L，Biro J，Miklodi D，Shkarupeta MM，Titova GA，Akopian TA，Govorun VM，2004. Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes and Infection*，6：536 – 541.

Li DL，Wang D，Wang GL，Fang HJ，Wang X，2002. The cloning and sequencing of cDNA encoded melittin. *Journal of Huaihai Institute of Technology*，11（3）：34 – 37.［李大力，王丹，王关林，方宏筠，汪信，2002. 蜂毒溶血肽（Melittin）cDNA 的克隆及序列分析. 淮海工学院学报，11（3）：34 – 37］

Liu YH，Chen SL，Zhang CX，2001. Advance in melittin research. *Entomological Knowledge*，38（6）：410 – 413.［刘艳荷，陈盛禄，张传溪，2001. 蜂毒溶血肽的研究进展. 昆虫知识，38（6）：410 – 413］

Pérez-Payá E，Ferrándiz C，Abad C，2002. The amphipathic peptide melittin as a tool to study the membrane-dependent activation of tissue transglutaminase. *Letters in Peptide Science*，8：69 – 76.

Shen LR，Zhang CX，Cheng JA，2002. Cloning and sequencing of genes encoding phospholipase A2 from the venom of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*. *Journal of Agricultural Biotechnology*，10（1）：29 – 32.［沈立荣，张传溪，程家安，2002. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A2 基因的克隆与序列分析. 农业生物技术学报，10（1）：29 – 32］

Shi WJ，Xu HJ，Cheng JA，Zhang CX，2004. Expression of the melittin gene of *Apis cerana cerana* in *E*. *coli*. *Protein Expression and Purification*, 37：213－219.

Shi WJ, Zhang SF, Zhang CX, Cheng JA, 2003. Cloning and sequencing of cDNA encoding prepromelittin in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(2)：254－258. [**施婉君，张素方，张传溪，程家安**，2003. **中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂毒前溶血肽原蛋白** cDNA **的克隆与序列分析**. **昆虫学报**，46(2)：254－258]

Sumikura H, Andersen OK, Drewes AM, Arendt Nielsen L, 2003. A comparison of hyperalgesia and neurogenic inflammation induced by melittin and capsaicin in humans. *Neuroscience Letters*, 337：147－150.

Vlasak R, Unger-ullmann C, Kreil G, Frischauf AM, 1983. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin. *Eur*. *J*. *Biochem*, 135：123－126.

Wang GL, Li DL, Fang HJ, 2000. Site-directed mutagenesis of melittin gene and its expression of *Escherichia coli*. *Acta Genetica Sinica*, 27(2)：176－182. [**王关林，李大力，方宏筠**，2000. **蜂毒溶血肽基因的定点诱变及其在大肠杆菌中的表达**. **遗传学报**，27(2)：176－182]

Winder D, Günzburg WH, Erfle V, Salmons B, 1998. Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242：608－612.

Zhang CX, Sun JX, Shi HJ, Chen ZY, Wu XF, 1999. High expression of EGFP gene in the cells of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Zoological Research*, 20(6)：468－470. [**张传溪，孙建新，施惠娟，陈哲宇，吴祥甫**，1999. EGFP **基因在粉蛾夜蛾细胞中的高效表达**. **动物学研究**，20(6)：468－470]

Zhang CX, Wu XF, 1998. DNA transfection of insect cells efficiently mediated by stearylamine liposome. *Chinese Journal of Biotechnology*, 4(1)：106－108. [**张传溪，吴祥甫**，1998. SA **脂质体介导** DNA **转染昆虫细胞的研究**. **生物工程学报**，4(1)：106－108]

Zhang SF, Shi WJ, Zhang CX, Cheng JA, 2003. Cloning and expression of a cDNA encoding secapin from the venom of *Apis cerana cerana*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 19(3)：149－154. [**张素方，施婉君，张传溪，程家安**，2003. **中华蜜蜂蜂毒镇静肽基因的** cDNA **克隆和表达**. **中国生物化学与分子生物学报**，19(3)：149－154]

（责任编辑：吴明宇）